

(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

EP 1 059 359 A2

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:
13.12.2000 Patentblatt 2000/50

(51) Int. Cl.⁷: **C12Q 1/37, G01N 33/573**

(21) Anmeldenummer: 00111738.1

(22) Anmeldetag: 02.06.2000

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE**
Benannte Erstreckungsstaaten:
AL LT LV MK RO SI

(71) Anmelder: **Aventis Behring GmbH**
35002 Marburg (DE)

(72) Erfinder:
• **Römisch, Jürgen, Dr.**
35041 Marburg (DE)
• **Feussner, Annette**
35043 Marburg (DE)
• **Stöhr, Hans-Arnold**
35093 Wetter (DE)

(30) Priorität: 10.06.1999 DE 19926531
17.05.2000 DE 10023923

(54) **Verfahren zur Bestimmung der Aktivität der Faktor VII-aktivierenden Protease aus Proteinlösungen**

(57) Es wird ein Verfahren zur Bestimmung der Aktivität der den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierenden Protease aus Proteinlösungen beschrieben, bei dem

- die die Protease und/oder ihr Proenzym enthaltende Proteinlösung mit einer Festphase inkubiert wird, an die zuvor ein gegen die Protease gerichteter Antikörper gekoppelt wurde und
- nach Auswaschen der Festphase die daran fixierte Protease und/oder ihr Proenzym mit Reagenzien inkubiert werden, die deren Aktivitätsbestimmung erlauben.

EP 1 059 359 A2

Beschreibung

[0001] Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur qualitativen und quantitativen Bestimmung der Faktor VII-aktivierenden Protease in komplexen Proteinlösungen wie Plasma.

[0002] Aus der deutschen Patentanmeldung 199 03 693.4 sind bereits Testsysteme und Verfahren zum qualitativen und quantitativen Nachweis einer Protease bekannt, die den Blutgerinnungsfaktor VII aktiviert. Diese umfassen chromogene Testverfahren, die auf der Spaltung markierter, niedermolekularer Peptidsubstrate und der photometrischen Bestimmung der dabei auftretenden Extinktion beruhen, sowie Testverfahren, bei denen die biologischen Eigenschaften der genannten Protease ausgenutzt werden. Dabei kann die Protease oder ihr Proenzym dadurch nachgewiesen werden, dass sie

a) eine die Blutgerinnungsfaktoren VIII/VIIIa oder V/Va inaktivierende Wirkung oder

b) in globalen Gerinnungstests eine die Blutgerinnungszeiten verkürzende Wirkung oder

c) eine Plasminogen-Aktivatoren aktivierende Wirkung oder

d) eine den FVII aktivierende Wirkung aufweist.

[0003] Die Bestimmung der Aktivität des FVII-Aktivators führt bei den bisher eingesetzten Bestimmungsverfahren jedoch nur dann zu zuverlässigen Ergebnissen, wenn die Protease in gereinigtem oder angereichertem Zustand vorliegt und keine störenden Einflüsse von Verunreinigungen das Messergebnis verfälschen. Besonders sehr komplexe Proteingemische wie Plasma oder Gewebeflüssigkeiten enthalten nun allerdings eine Vielzahl von Proteinen, die eine spezifische Bestimmung des Faktor VII-Aktivators verhindern oder zumindest behindern können. Außerdem liegt die Protease nach dem derzeitigen Wissensstand im Plasma vor allem als Proenzym vor, so dass eine Aktivierung zur aktiven Protease zum Zwecke der anschließenden Aktivitätsbestimmung nötig ist.

[0004] Die Faktor VII-aktivierende Protease ist ein Plasmaprotein, das an der Regulation der Hämostase, vor allem durch Mitwirkung an Gerinnungs- und Fibrinolyseprozessen, beteiligt ist. Deshalb ist die Untersuchung der Funktion und der biologischen Aktivität der Protease von hohem Interesse. So könnte zum Beispiel ein erniedrigter Antigengehalt und/oder eine Störung der biologischen Aktivität, beispielsweise durch eine Genmutation, ein erhöhtes Thromboserisiko anzeigen. Es stellte sich deshalb die Aufgabe, ein Verfahren zu entwickeln, das die möglichst einfache und spezifische Bestimmung einer oder mehrerer biologischer Aktivitäten der Faktor VII-aktivierenden Protease ermöglicht. Da die physiologische Aufgabe dieser Protease bisher noch unklar ist, sollte diese Methode prinzipiell die Bestimmung mehrerer Aktivitäten erlauben.

[0005] Es wurde nun gefunden, dass diese Anforderungen durch ein Verfahren zur Bestimmung der Aktivität der den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierenden Protease in Proteinlösungen erfüllt werden, bei dem

- die der Protease und/oder ihr Proenzym enthaltende Proteinlösung mit einer Festphase inkubiert wird, an die zuvor ein gegen die Protease gerichteter Antikörper gekoppelt wurde und
- nach Auswaschen der Festphase die daran fixierte Protease und/oder ihr Proenzym mit Reagenzien inkubiert werden, die deren Aktivitätsbestimmung erlauben.

[0006] Dieses Bestimmungsverfahren lässt sich überraschenderweise nicht nur auf die Protease in ihrer aktivierten Form anwenden. Obwohl die bisherigen Untersuchungsergebnisse darauf schließen lassen, dass die Protease im Plasma hauptsächlich als Proenzym zirkuliert und es daher zu erwarten war, dass dieses nach Bindung an die oben genannte Festphase erst noch aktiviert werden muss, um danach ihre biologischen Aktivitäten entfalten zu können, wurde nun überraschenderweise gefunden, dass eine solche Aktivierung nicht notwendig ist, sondern dass das aus dem Plasma an die Festphase gebundene Proenzym in immobilisierter Form seine biologische Aktivität in gleicher Weise entfaltet wie das aktive Enzym. Dadurch erübrigt sich ein gesonderter Aktivierungsschritt und ermöglicht eine weitaus schnellere und störungsfreiere Bestimmung.

[0007] Eine spezifische Aktivierung des Proenzyms kann aber durchaus noch angeschlossen werden, um sicherzustellen, dass das gebundene Proenzym vollständig aktiviert wurde.

[0008] Als Festphase kommen die dem Fachmann bekannten Matrices wie aktivierte Sepharose® oder Fraktogel® in Frage. Vorzugsweise werden Mikrotiterplatten mit gegen die Protease gerichteten Antikörpern beschichtet, die polyclonaler oder monoklonaler Herkunft sein können. Auch Antikörperfragmente wie F(ab) oder F(ab)₂ können verwendet werden. Im Gegensatz zum Antigentest, in dem ein markierter Zweitantikörper zur Detektion und dann auch zur Quantifizierung verwendet wird, werden erfindungsgemäß chromogene Substrate zugesetzt, die die Aktivitätsbestimmung der Protease zulassen. Ein besonders bevorzugtes chromogenes Substrat ist S2288 von Chromogenix AB (H-D-iso-

leucyl-L-prolyl-L-arginin-pNA \times 2 HCl), das ebenso wie ähnliche Verbindungen eine signifikante konzentrations- und zeitabhängige Zunahme der Absorption durch Amidolyse des Substrats zeigt. Überraschenderweise behält die Protease ihre biologischen Aktivitäten und Eigenschaften auch nach Bindung an den Antikörper bei, nämlich die Fähigkeit FVII und Plasminogen-Aktivatoren zu aktivieren. Dadurch wird die spezifische Bestimmung der Funktionalität der Protease aus einer komplexen Proteinlösung heraus möglich.

[0009] Neben den chromogenen Substraten bieten sich auch die übrigen in der deutschen Patentanmeldung 199 03 693.4 erwähnten Substrate zur Aktivitätsbestimmung an, also die Inaktivierung der Blutgerinnungsfaktoren VIII/VIIIa oder V/Va und auch die Aktivierung des FVII und der Plasminogenaktivatoren. Dabei kann zum Beispiel der so aktivierte Anteil an Faktor VII durch direkte Amidolyse eines für den FVII spezifischen chromogenen Substrats bestimmt werden oder durch eine gekoppelte Reaktion wie den sog. FVIIa-rTF-Test. Die Aktivierung von Einkettenplasminogen-aktivatoren scuPA (single chain urokinase plasminogen activator) oder der sctPA (single chain tissue plasminogen activator) lässt sich einfach durch Substratumsetzung von zum Beispiel S2444 (pyroGlu-Gly-Arg-pNA \times HCl) verfolgen. Wie in der deutschen Patentanmeldung 199 03 693.4 beschrieben, können zum Nachweis auch Substanzen zugesetzt werden, die die Aktivität der Protease stimulieren, zum Beispiel lösliche Kalziumsalze und/oder Heparin oder dem Heparin verwandte Substanzen wie Dextransulfat.

[0010] Weitere Untersuchungen von Lösungen, Körperflüssigkeiten und Zell- bzw. Gewebeextrakten mit Hilfe des beschriebenen Verfahrens zeigten dessen Eignung zur Detektion bzw. Quantifizierung der FVII-aktivierenden Protease. Darunter sind die diese Protease enthaltende Lösungen zu verstehen, wie Intermediate der Präparation der Protease, Zellkultur-Überstände, die auch bei der Fermentation entsprechender Zellen zur rekombinanten Expression anfallen. Darunter sind auch Lösungen zu verstehen, die bei der transgenen Herstellung der Protease bzw. des Proenzymes anfallen, wie Milch.

[0011] Darüber hinaus eignet sich das Verfahren zur Bestimmung der Aktivität der FVII-aktivierenden Protease in Extrakten von Geweben oder Zellen, die einen Eindruck über das Vorhandensein der Proteaseaktivität gibt bzw. über potentielle pathologische Zustände bei Über- oder Unterexpression dieses Proteins.

[0012] Ein besonderes Interesse gilt dem Nachweis der Proteaseaktivitäten in Körperflüssigkeiten, wie Blut und Plasma, Seminalplasma, Urin, Cerebrospinalflüssigkeit, Bronchioalveolar-Lavage, Fruchtwasser, Speichel oder Tränenflüssigkeit. Einen wertvolle Ergänzung zum Aktivitätstest stellt dabei das in der deutschen Patentanmeldung 199 03 693.4 erwähnte Antigenbestimmungssystem (z.B. ELISA) dar, da mit Hilfe beider Parameter ein umfassenderes Bild beispielsweise bei einer Erkrankung erhalten werden kann.

[0013] Bei der Untersuchung gesunder Blutspender fiel auf, daß ca. 5-10% der untersuchten Plasmen eine gegenüber einem Standard (Poolplasmen) deutlich geringere Proteaseaktivität aufwiesen (etwa 30-50% des 'Durchschnittswertes'), wie in Beispiel 1 näher ausgeführt. Diese Information wurde dadurch ergänzt, daß nahezu alle dieser Spender im Normalbereich befindliche Antigengehalte aufwiesen. Dies könnte beispielsweise auf (heterozygote) Mutation(en) hinweisen, die die Aktivität, jedoch nicht den Antigengehalt, einer Plasmaprobe entsprechend beeinflussen würden. Als Konsequenz könnten diese Donoren eine Risikogruppe für bestimmte Krankheiten darstellen und gegebenenfalls prophylaktische Maßnahmen frühzeitig ergriffen werden. Dies gilt sowohl für Personen, die erhöhte als auch erniedrigte Aktivitätsspiegel aufweisen. Signifikant erhöhte Aktivitäten dieser Protease (bei teilweise normalem oder leicht erhöhten Antigengehalt) fanden wir in Plasmen von Patienten mit Herzinfarkten (siehe auch Beispiel 2) und stabiler und instabiler Angina pectoris verglichen mit einem Kollektiv gesunder Spender. Bislang ist noch nicht geklärt, ob eine Erhöhung der Proteaseaktivität als eine Ursache dieser Erkrankung gewertet werden kann oder ob diese eher einer Gegenreaktion des Körpers entspricht, im Sinne einer gesteigerten Thrombolyse.

[0014] Abgesehen von der physiologischen Relevanz der erhöhten Proteaseaktivitäten kann dieser Parameter zur frühen Erkennung und als Kriterium einer Veränderung des Krankheitsbildes verwendet werden. Dies schließt die Diagnostik weiterer Herz-Kreislauf assoziierter Komplikationen ein.

[0015] Über diese Indikationen hinaus kann das beschriebene Testsystem (auch in Kombination mit einer Antigenbestimmung) zur Diagnose und Therapieverfolgung auch bei malignen Erkrankungen, Entzündungen, Autoimmunerkrankungen, Vaskulitiden, respiratorischen Defekten bzw. zur Hämostasediagnostik (Gerinnung und Fibrinolyse), wie auch bei Sepsis und assoziierten Reaktionen, wie der disseminierten intravasalen Gerinnung verwendet werden. Weitere Anwendungsgebiete umschließen die Diagnose von Organdefekten, wie zerebralen, respiratorischen und Nierenerkrankungen. In Patienten mit Leberzirrhose fanden wir signifikant erniedrigte Aktivitäten der Protease, die in den meisten Fällen mit erniedrigten Antigenspiegeln einhergehen.

[0016] Weitere Untersuchungen zeigten, daß neben einem moderaten Anstieg des Antigenspiegels im Plasma gesunder Schwangerer ein deutlicher Anstieg der Proteaseaktivität im Verlauf von Schwangerschaften zu beobachten ist, mit höchsten Werten im dritten Trimester. Ein Ausbleiben eines solchen Anstieges der Protease kann mit einem Risiko für Mutter und Kind während der Schwangerschaft verbunden sein, wie thromboembolischen Komplikationen etc. bis hin zur Früh- und Fehlgeburt oder Mißbildung des Fötus.

[0017] Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele erläutert:

Beispiel 1

[0018] Mikrotiterplatten (96 wells) wurden mit einem monoklonalen Antikörper gegen den FVII-Aktivator beschichtet, indem in jede Vertiefung 150 µl einer 10 µg/ml enthaltenden Lösung pipettiert wurde. Nach 16-stündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Platte mehrmals gewaschen. In die Vertiefungen wurden jeweils 100 µl steigender Konzentrationen gereinigter Protease bzw. verschiedene Verdünnungen eines Standardhumanplasmas (SHPL) pipettiert. Nach Inkubation bei 37°C wurden die Lösungen durch mehrmaliges Waschen entfernt und die Aktivitäten bestimmt.

[0019] In jede Vertiefung wurden 50 µl einer Prourokinase-Lösung (10 µg/ml, American Diagnostica, US) pipettiert sowie 50 µl Puffer, der 30 mM CaCl₂ und 100 IU/ml Heparin enthielt. Zwei Minuten später wurden weitere 100 µl Puffer und 25 µl des Substrates S2444 (3 mM) hinzugegeben. Die Zunahme der Absorption bei 405 nm pro Minute wurde ermittelt.

Protease, gereinigt (µg/ml)	Δ mOD/min	SHPL (Verdünnung)	Δ mOD/min
0	0,4	buffer	0,4
0,1	7	1:200	0,4
0,2	12	1:100	0,9
0,4	18	1:50	7,5
0,6	22	1:33,3	8,4
0,8	24	1:25	15,2
1,0	27	1:20	24,8
2,0	34	1:10	31,2

Beispiel 2

[0020] Die Beschichtung der Mikrotiterplatten und die Inkubation mit den Probelösungen wurde durchgeführt wie in Beispiel 1 beschrieben. Anstelle der Aktivierung der Prourokinase wurde die Aktivierung des Faktors VII bestimmt. Dazu wurden je 50 µl Puffer, enthaltend 30 mM CaCl₂ und 100 IU/ml Heparin, für 2 Minuten bei Raumtemperatur in die Vertiefungen der Platte gegeben. Nach Zusatz von weiteren 100 µl Puffer und 25 µl Spectrozym® VIIa (3 mM, American Diagnostica/US) wurde die Δ mOD/min bestimmt.

Protease, gereinigt (µg/ml)	Δ mOD/min	SHPL (Verdünnung)	Δ mOD/min
0	0,3	buffer	0,3
0,2	1,8	1:100	0,3
0,4	2,8	1:50	0,3
0,6	3,0	1:33,3	0,8
0,8	3,6	1:25	3,2
1,0	4,7	1:20	7,2
1,5	7,1	1:13,3	8,4
2,0	7,9	1:10	11,5

[0021] Mit Hilfe dieser Verdünnungsreihen ist es möglich, individuelle Plasmen zu vergleichen und die Funktionalität der Protease zu bestimmen. Durch Vergleich mit einem Standardhumanplasma, das einen Pool von hundert von

Einzelplasmen darstellt, können signifikante Abweichungen von der Norm erfasst werden. Die so ermittelte Aktivität sollte idealerweise in das Verhältnis zum Antigengehalt gesetzt werden, der zum Beispiel mittels ELISA bestimmt werden kann. Ist die Proteasemenge bekannt, dann lässt sich die spezifische Aktivität der in der Proteinlösung enthaltenen Protease sowie dessen Proenzym bestimmen.

5

Beispiel 3

Bestimmung der Proteaseaktivität in 190 Plasmen gesunder Spender

10 [0022] 190 Citrat-Plasmen gesunder Personen, davon 140 Männer und 50 Frauen, wurden mit Hilfe des beschriebenen Aktivitätstestes untersucht. Um festzustellen, ob potentiell vom Durchschnittswert aller untersuchten Plasmen abweichende Aktivitäten mit einer entsprechenden Veränderung des Protease Antigenspiegels einhergingen, wurde ein ELISA verwendet, wie in der deutschen Patentanmeldung 199 03 693.4 beschrieben. Ein solcher ELISA zum Nachweis der Protease als Antigen ist mit Hilfe monoklonaler oder polyklonaler spezifischer Antikörper gegen diese Protease machbar.

15 [0023] **Abbildung (1)** zeigt die Proteaseaktivitäten der untersuchten gesunden Männer (A) und Frauen (B). Es wird deutlich, daß 5-10%, sowohl Männer als auch Frauen, eine gegenüber dem Durchschnitt deutlich verminderte Aktivität aufweisen.

20 [0024] Die Proteaseaktivitäten (y-Achse) und die dazu gehörenden Antigenspiegel der entsprechenden Personen (x-Achse) sind in der Abbildung dargestellt. Die arbiträren 'Normalbereiche' der Antigen- und Aktivitätsspiegel sind durch waagerechte und senkrechte Linien als obere und untere Begrenzungen der Parameter jeweils gezeigt. Die sich daraus ergebenden Rechtecke (in jeweils der Mitte der Abbildung) stellen demnach die 'Normalbereiche' gesunder Spender dar. Hier wird nochmals besonders deutlich, daß die Mehrzahl der Proben mit verminderter Aktivität nicht mit einer entsprechenden Verminderung der Antigenspiegel einherging. Dies könnte auf eine heterozygote Mutation (oder mehrere) hinweisen, d.h. beispielsweise könnten ca. 50% der Proteasemoleküle durch eine oder mehrere Mutationen so verändert sein, daß eine Reaktion mit biologischen Substraten nicht mehr gewährleistet ist. Im Falle einer fibrinolytischen Bedeutung der Protease könnte dies mit einem Thromboserisiko (oder für andere Erkrankungen etc.) dieser derzeit noch 'gesunden' Population verbunden sein. Obwohl in der Minderzahl der untersuchten Proben, sind die Werte der reduzierten Proteaseaktivität, die sehr wohl mit einem verminderten Antigengehalt einhergehen, als nicht minder

30 interessant zu bewerten, da offensichtlich eine Dysregulation der plasmatischen Verfügbarkeit der Protease vorliegt, die mit einem vergleichbaren Risiko wie beschrieben verbunden sein kann.

[0025] Entsprechend ist die Detektion der Proteaseaktivität, auch im Verbund mit der Antigenbestimmung, als ein Parameter zur Früherkennung und Prophylaxe-/Therapiekontrolle zu sehen.

35 Beispiel 4

Bestimmung der Proteaseaktivität in Plasmen schwangerer Frauen

40 [0026] Zitratplasmen schwangerer Frauen wurden, wie in Beispiel 3 beschrieben, getestet. Proben wurden an verschiedenen Zeitpunkten der Schwangerschaft gewonnen und anschließend untersucht.

[0027] Die Verläufe zweier unproblematischer Schwangerschaften sind in Tabelle 1 dargestellt. Ein deutlicher Anstieg der Proteaseaktivität mit Dauer der Schwangerschaft ist zu erkennen, wogegen die Antigengehalte der Protease nicht bis moderat ansteigen. Ein Ausbleiben dieser erhöhten Aktivität könnte mit Problemen für Mutter und Fötus verbunden sein.

45 [0028] Gesunde (nicht Schwangere) zeigen dagegen einen kontinuierlichen Verlauf der Proteaseaktivitäten (weder erhöht noch vermindert, im Rahmen der Testschwankungen) während einer entsprechend Beobachtungszeit (nicht dargestellt).

50

Tabelle 1

Die prozentualen Angaben beziehen sich auf Durchschnittswerte gesunder (nicht schwangerer) Frauen.				
	Antigen (%)		Aktivität (%)	
Trimester der Schwangerschaft	Schwangere		Schwangere	
	1	2	1	2

55

Tabelle 1 (fortgesetzt)

Die prozentualen Angaben beziehen sich auf Durchschnittswerte gesunder (nicht schwangerer) Frauen.				
	Antigen (%)		Aktivität (%)	
Trimester der Schwangerschaft	Schwangere		Schwangere	
I	103	105	110	115
II	118	123	158	176
III	126	143	215	280

Beispiel 5

Bestimmung der Proteaseaktivität in Herzinfarktplasmen

[0029] Plasmen von 54 Patienten mit akutem Myokardinfarkt wurden bei Einlieferung (vor Intensivbehandlung) in die Notfallstation gewonnen und für die Routineanalytik verwendet. Später wurden Plasmareste (nicht aufgetaute Aliquots) zur Quantifizierung der Proteaseaktivitäten (und Antigengehalte) verwendet.

[0030] Die **Abbildung (2)** faßt die Ergebnisse der Untersuchung zusammen. Gegenüber einem Kollektiv gesunder Spender (**B**) sind in Plasmen von Patienten mit akutem Myokardinfarkt (**A**) signifikant höhere Proteaseaktivitäten (und auch der Antigengehalte) zu messen.

[0031] Entsprechend können diese Parameter zur Früherkennung eines Infarktes, also auch bei stabiler und instabiler Angina pectoris, verwendet werden. Bei Patienten mit diesen koronaren Herzerkrankungen fanden wir ebenfalls im Durchschnitt signifikant erhöhte Aktivitäten. Die Höhe der gemessenen Werte kann eine Bewertung des Schweregrades der Krankheit ermöglichen bzw. im Verlaufe einer Infarkt- und Angina pectoris Prophylaxe und Therapie wertvolle Hinweise über den Zustand des Patienten geben. Darüber hinaus können diese Parameter zur Beurteilung anderer mit dem Herz-Kreislaufsystem assoziierter Komplikationen verwendet werden.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung der Aktivität der den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierenden Protease aus Proteinlösungen, **dadurch gekennzeichnet**, dass

- die die Protease und/oder ihr Proenzym enthaltende Proteinlösung mit einer Festphase inkubiert wird, an die zuvor ein gegen die Protease gerichteter Antikörper gekoppelt wurde und
- nach Auswaschen der Festphase die daran fixierte Protease und/oder ihr Proenzym mit Reagenzien inkubiert werden, die deren Aktivitätsbestimmung erlauben.

2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Aktivität der Protease gemessen wird durch eine photometrische Bestimmung der bei Einwirkung auf chromogene Substrate auftretenden Extinktion.

3. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Aktivität der Protease gemessen wird durch

- ihre die Blutgerinnungsfaktoren VIII/VIIIa oder V/Va inaktivierende Wirkung oder
- ihre die Blutgerinnungszeiten verkürzende Wirkung in globalen Gerinnungstests oder
- ihre Plasminogen-Aktivatoren aktivierende Wirkung oder
- ihre den FVII aktivierende Wirkung.

4. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß der gegen die Protease gerichtete Antikörper ein polyklonaler oder monoklonaler Antikörper oder ein F(ab) oder F(ab)₂-Antikörperfragment ist.

5. Kit zur Bestimmung der den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierenden Protease.

6. Verfahren zur Früherkennung eines infarktes, stabiler oder instabiler Angina Pectoris, **dadurch gek nnzeichnet**, daß als Parameter die den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierende Protease bestimmt wird.
- 5 7. Verfahren zur Diagnose des Verlaufs bzw. des Schweregrades eines Infarktes bzw. des Erfolgs von Prophylaxe und/oder Therapie bei Angina Pectoris, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Parameter die den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierende Protease bestimmt wird.
8. Verfahren zur Schwangerschaftsüberwachung, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Parameter die den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierende Protease bestimmt wird.
- 10 9. Verfahren zur Früherkennung eines Thromboserisikos, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Parameter die den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierende Protease bestimmt wird.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

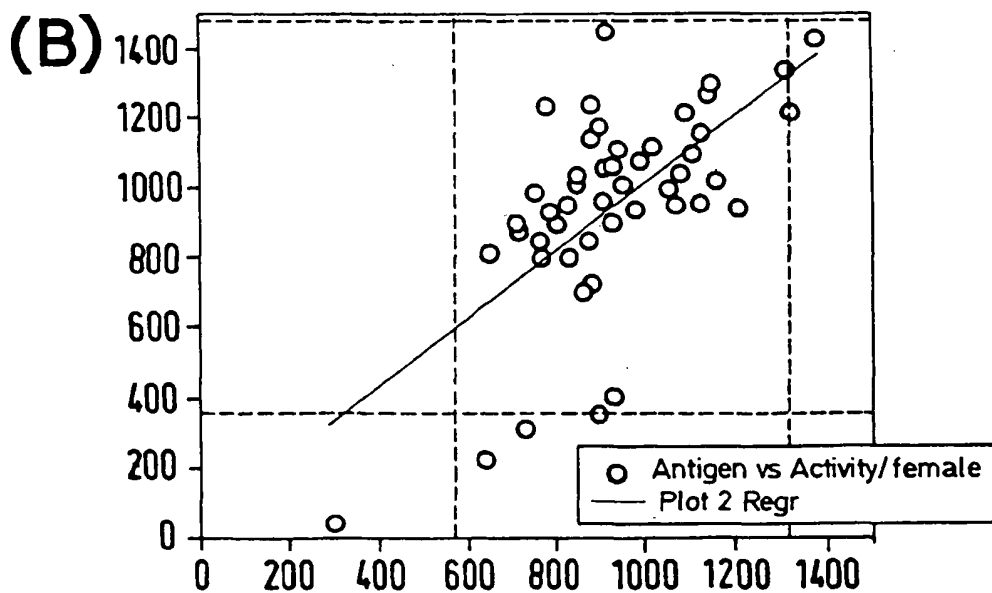
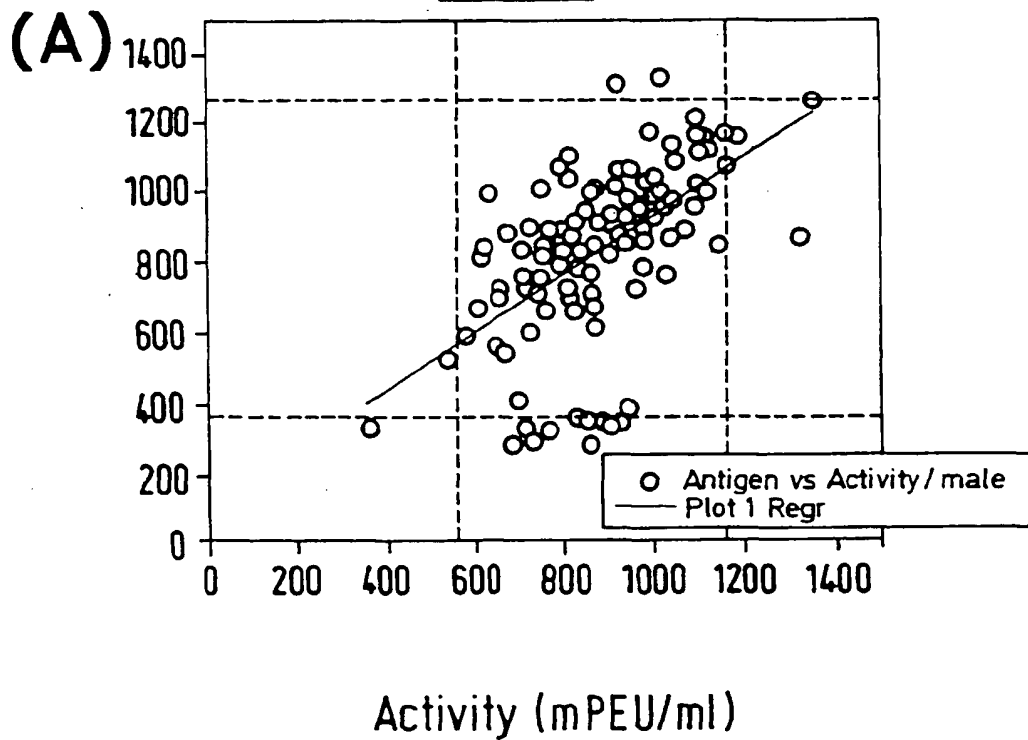
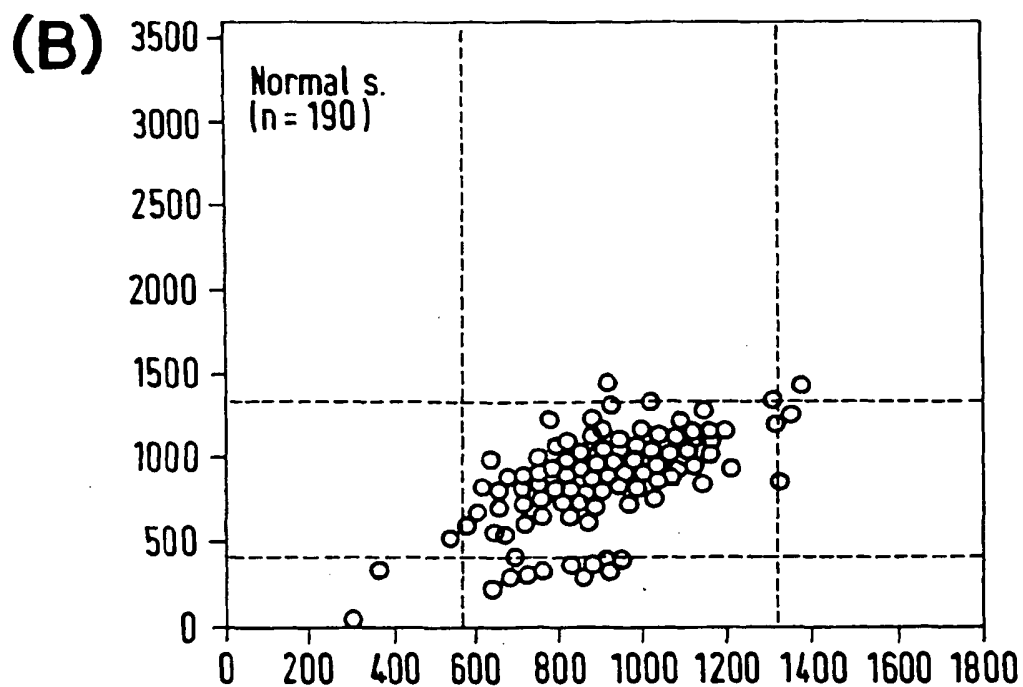
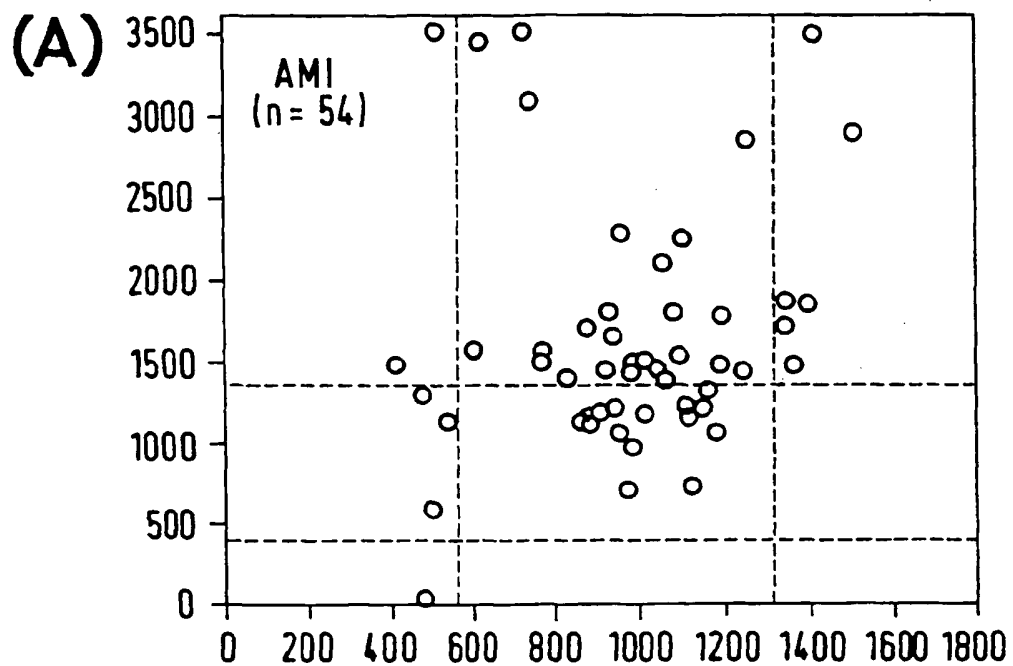
FIG.1

FIG. 2

AVENTIS BEHRING GMBH

1999/Z007- Ma 1207- C38

Procedure for the determination of the activity of the protease which activates factor VII from protein solutions

The invention relates to a procedure for the qualitative and quantitative determination of the protease which activates factor VII in complex protein solutions such as plasma.

German Patent Application 199 03 693.4 already discloses test systems and procedures for the qualitative and quantitative detection of a protease which activates blood clotting factor VII. These include chromogenic test procedures, which are based on the cleavage of labeled, low molecular weight peptide substrates and the photometric determination of the extinction occurring in this case, and test procedures in which the biological properties of the protease mentioned are utilized. In these procedures, the protease or its proenzyme can be detected in that it has

- a) an action which inactivates blood clotting factors VIII/VIIIa or V/Va or
- b) an action which reduces the blood clotting times in global clotting tests or
- c) an action which activates plasminogen activators or
- d) an action which activates FVII.

In the determination procedures previously employed, however, the determination of the activity of the FVII activator only leads to reliable results if the protease is present in a purified or enriched state and no interfering effects of impurities distort the measurement result. Especially very complex protein mixtures such as plasma

or tissue fluids, however, contain a large number of proteins which can prevent or at least hinder a specific determination of the factor VII activator. Moreover, according to the present level of knowledge, the protease is present in the plasma especially as a proenzyme, such that activation to give the active protease is necessary for the purpose of the subsequent activity determination.

The factor VII-activating protease is a plasma protein which is involved in the regulation of hemostasis, especially by cooperation in clotting and fibrinolysis processes. The investigation of the function and of the biological activity of the protease is therefore of high interest. For example, a lowered antigen content and/or a disruption of the biological activity, for example due to a gene mutation, could thus indicate an increased risk of thrombosis. The object is therefore to develop a procedure which makes possible the determination in a manner which is as simple and specific as possible of one or more biological activities of the factor VII-activating protease. Since the physiological task of this protease is still unclear, this method should in principle allow the determination of a number of activities.

It has now been found that these requirements are fulfilled by a procedure for the determination of the activity of the protease which activates the blood clotting factor VII in protein solutions, in which

- the protein solution comprising the protease and/or its proenzyme is incubated with a solid phase to which an antibody directed against the protease has been coupled beforehand and
- after washing the solid phase the protease and/or its proenzyme fixed thereto are incubated with reagents which allow determination of their activity.

Surprisingly, this determination procedure can be used not only on the protease in its activated form. Although the previous investigation results allowed it to be concluded that the protease circulates in plasma mainly as a proenzyme and it was therefore to be expected that this must first still be activated after binding to the abovementioned solid phase in order then to be able to display its biological

activities, it has now surprisingly been found that such an activation is not necessary, but that the proenzyme bound to the solid phase from the plasma displays its biological activity in immobilized form in the same manner as the active enzyme. A separate activation step is thereby unnecessary and a far more rapid and interference-free determination is made possible.

A specific activation of the proenzyme, however, can definitely still be added in order to ensure that the bound proenzyme has been completely activated.

Suitable solid phases are the matrices known to the person skilled in the art, such as activated Sepharose® or Fraktogel®. Microtiter plates are preferably coated with antibodies directed against the protease, which can be of polyclonal or monoclonal origin. Antibody fragments such as F(ab) or F(ab)₂ can also be used. Unlike the antigen test, in which a labeled second antibody is used for detection and then also for quantification, according to the invention chromogenic substrates are added which allow the determination of the activity of the protease. A particularly preferred chromogenic substrate is S2288 from Chromogenix AB (H-D-isoleucyl-L-prolyl-L-arginine-pNA × 2 HCl), which just like similar compounds shows a significant concentration- and time-dependent increase in the absorption due to amidolysis of the substrate. Surprisingly, the protease retains its biological activities and properties even after binding to the antibody, namely the capability to activate FVII and plasminogen activators. The specific determination of the functionality of the protease from a complex protein solution is thereby possible.

In addition to the chromogenic substrates, the other substrates mentioned in German Patent Application 199 03 693.4 also offer themselves for the activity determination, i.e. the inactivation of the blood clotting factors VIII/VIIIa or V/Va and also the activation of the FVII and the plasminogen activators. In this determination, for example, the proportion of factor VII thus activated can be determined by direct amidolysis of a chromogenic substrate which is specific for the FVII or by a coupled reaction such as the so-called FVIIa-rTF test. The activation of single-chain plasminogen activators (scuPA, single chain urokinase plasminogen activator or sctPA, single chain tissue plasminogen activator) can be simply monitored by substrate reaction of, for example, S2444 (pyroGlu-Gly-Arg-pNA × HCl). As

described in German Patent Application 199 03 693.4, substances can also be added for detection which stimulate the activity of the protease, for example soluble calcium salts and/or heparin or substances related to heparin such as dextran sulfate.

Further investigations of solutions, body fluids and cell or tissue extracts with the aid of the described process showed its suitability for the detection or quantification of the FVII-activating protease. Among these are to be understood the solutions containing this protease, such as intermediates of the preparation of the protease and cell culture supernatants, which are also obtained in the fermentation of appropriate cells for recombinant expression. Among these are also to be understood solutions which are obtained in the transgenic preparation of the protease or of the proenzyme, such as milk.

The process is moreover suitable for the determination of the activity of the FVII-activating protease in extracts of tissues or cells, which gives an impression about the presence of the protease activity or about potential pathological conditions in the case of over- or underexpression of this protein.

A particular interest applies to the detection of the protease activities in body fluids, such as blood and plasma, seminal plasma, urine, cerebrospinal fluid, bronchioalveolar lavage, amniotic fluid, saliva or lacrimal fluid. A valuable supplement to the activity test here is the antigen determination system (e.g. ELISA) mentioned in German patent application 199 03 693.4, as with the aid of both parameters a more comprehensive picture can be obtained, for example, in the case of a disorder.

In the investigation of healthy blood donors, it was conspicuous that about 5-10% of the plasmas investigated had a markedly lower protease activity (approximately 30-50% of the 'average value'), compared with a standard (pool plasmas), as displayed in greater detail in Example 1. This information was supplemented by the fact that almost of all these donors had antigen contents in the normal range. This could indicate, for example, (heterozygotic) mutation(s) which would correspondingly influence the activity, but not the antigen content, of a plasma

sample. As a consequence, these donors could be a risk group for certain diseases and, if necessary, prophylactic measures could be taken early. This applies either to people who have increased or lowered activity levels. We found significantly increased activities of this protease (with in some cases a normal or slightly increased antigen content) in plasmas of patients with cardiac infarcts (see also Example 2) and stable and unstable angina pectoris compared with a group of healthy donors. As yet, it is still not clear whether an increase in the protease activity can be assessed as a cause of this condition or whether this more likely corresponds to a counterreaction of the body, in the sense of increased thrombolysis.

Apart from the physiological relevance of the increased protease activities, this parameter can lead to early detection and can be used as a criterion of a change in the syndrome. This includes the diagnosis of further cardiovascular-associated complications.

Beyond these indications, the test system described (also in combination with an antigen determination) can also be used for diagnosis and therapeutic monitoring in the case of malignant diseases, inflammation, autoimmune diseases, vasculitis, respiratory defects or for the diagnosis of hemostasis (clotting and fibrinolysis), and also in the case of sepsis and associated reactions, such as disseminated intravascular clotting. Further application areas include the diagnosis of organ defects, such as cerebral, respiratory and kidney diseases. In patients with cirrhosis of the liver, we found significantly decreased activities of the protease, which in most cases were accompanied by decreased antigen levels.

Further investigations showed that in addition to a moderate increase in the antigen level in the plasma of healthy pregnant women, a marked increase in the protease activity is to be observed in the course of pregnancies, with the highest values in the third trimester. An absence of such an increase in the protease can be associated with a risk for the mother and child during the pregnancy, such as thromboembolic complications etc. up to and including premature birth and miscarriage or malformation of the fetus.

The invention is illustrated by the following examples:

Example 1

Microtiter plates (96 wells) were coated with a monoclonal antibody against the FVII activator by pipetting 150 μ l of a solution comprising 10 μ g/ml into each hollow. After incubation at room temperature for 16 hours, the plates were washed several times. 100 μ l of increasing concentrations of purified protease or various dilutions of a standard human plasma (SHPL) were in each case pipetted into the hollows. After incubation at 37°C, the solutions were removed by washing several times and the activities were determined.

50 μ l of a prourokinase solution (10 μ g/ml, American Diagnostica, US) were pipetted into each hollow, as were 50 μ l of buffer, which contained 30 mM CaCl_2 and 100 IU/ml of heparin. Two minutes later, a further 100 μ l of buffer and 25 μ l of the substrate S2444 (3 mM) were added. The increase in the absorption at 405 nm per minute was determined.

Protease, purified (μ g/ml)	Δ mOD/min	SHPL (dilution)	Δ mOD/min
0	0.4	buffer	0.4
0.1	7	1:200	0.4
0.2	12	1:100	0.9
0.4	18	1:50	7.5
0.6	22	1:33.3	8.4
0.8	24	1:25	15.2
1.0	27	1:20	24.8
2.0	34	1:10	31.2

Example 2

The coating of the microtiter plates and the incubation with the sample solutions was carried out as described in Example 1. Instead of the activation of the prourokinase, the activation of the factor VII was determined. To this end, in each case 50 μ l of buffer, comprising 30 mM CaCl_2 and 100 IU/ml of heparin, were added to the hollows of the plate for 2 minutes at room temperature. After addition of a further 100 μ l of buffer and 25 μ l of Spectrozym® VIIa (3mM, American Diagnostica/US), the Δ mOD/min was determined.

Protease, purified (μ g/ml)	Δ mOD/min	SHPL (dilution)	Δ mOD/min
0	0.3	buffer	0.3
0.2	1.8	1:100	0.3
0.4	2.8	1:50	0.3
0.6	3.0	1:33.3	0.8
0.8	3.6	1:25	3.2
1.0	4.7	1:20	7.2
1.5	7.1	1:13.3	8.4
2.0	7.9	1:10	11.5

With the aid of these dilution series, it is possible to compare individual plasmas and to determine the functionality of the protease. By comparison with a standard human plasma which represents a pool of hundreds of individual plasmas, significant deviations from the norm can be detected. The activity thus found should ideally be set in the ratio to the antigen content which can be determined, for example, by means of ELISA.

If the amount of protease is known, then the specific activity of the protease and its proenzyme contained in the protein solution can be determined.

Example 3

Determination of the protease activity in 190 plasmas of healthy donors

190 citrate plasmas of healthy people, of which 140 were men and 50 women, were investigated with the aid of the activity test described. In order to determine whether activities differing potentially from the average value of all investigated plasmas accompanied a corresponding change in the protease antigen level, an ELISA was used as described in German patent application 199 03 693.4. Such an ELISA for the detection of the protease as an antigen is feasible with the aid of monoclonal or polyclonal specific antibodies against this protease.

Figure (1) shows the protease activities of the investigated healthy men (A) and women (B). It is clear that 5-10%, both men and women, show a markedly decreased activity compared with the average.

The protease activities (y-axis) and the antigen levels of the corresponding people (x-axis) belonging to them are shown in the figure. The arbitrary 'normal ranges' of the antigen and activity levels are in each case shown by horizontal and vertical lines as upper and lower limits of the parameters. The rectangles resulting therefrom (in each case in the center of the figure) accordingly represent the 'normal ranges' of healthy donors. It is again particularly clear here that the majority of the samples having decreased activity were not accompanied by a corresponding reduction of the antigen levels. This could indicate a heterozygotic mutation (or several), i.e. for example about 50% of the protease molecules could be modified by one or more mutations such that a reaction with biological substrates is no longer guaranteed. In the case of a fibrinolytic importance of the protease, this could be associated with a risk of thrombosis (or of other diseases etc.) of this presently still 'healthy' population, although in the minority of the samples investigated the values of the reduced protease activity, which go along very well with a reduced antigen content, are to be assessed as no less interesting, as obviously a dysregulation of the plasma availability of the protease is present, which can be associated with a comparable risk as described.

Accordingly, the detection of the protease activity, also in association with antigen determination, can be seen as a parameter for early recognition and prophylaxis/therapeutic control.

Example 4

Determination of the protease activity in plasma of pregnant women

Citrate plasma of pregnant women was tested as described in Example 3. Samples were obtained at various times during pregnancy and then investigated.

The courses of two unproblematic pregnancies are shown in Table 1. A clear increase in the protease activity with duration of the pregnancy is to be detected, compared with which the antigen contents of the protease show no increase to a moderate increase. An absence of this increased activity could be associated with problems for the mother and fetus.

Healthy (nonpregnant) women, on the other hand, show a continuous course of the protease activities (neither increased nor decreased, in the context of the test variations) during a corresponding observation period (not shown).

Table 1

The percentage data relate to average values of healthy (nonpregnant) women.

Trimester of pregnancy	Antigen (%)		Activity (%)	
	Pregnant women		Pregnant women	
	1	2	1	2
I	103	105	110	115
II	118	123	158	176
III	126	143	215	280

Example 5

Determination of the protease activity in cardiac infarct plasma

Plasma from 54 patients with acute myocardial infarct was obtained on admission (before intensive treatment) to the emergency ward and used for routine analysis. Later, plasma residues (unthawed aliquots) were used for the quantification of the protease activities (and antigen contents).

Figure (2) summarizes the results of the investigation. Compared with a group of healthy donors (**B**), significantly higher protease activities (and also the antigen contents) can be measured in the plasma of patients with acute myocardial infarct (**A**).

Accordingly, these parameters can be used for the early detection of an infarct, i.e. even in the case of stable and unstable angina pectoris. In patients with these coronary heart disorders, we also found significantly increased activities on average. The height of the measured values can make possible evaluation of the degree of severity of the disease or give valuable indications about the condition of the patient in the course of infarct and angina pectoris prophylaxis and therapy. Moreover, these parameters can be used for the assessment of other complications associated with the cardiovascular system.

AVENTIS BEHRING GMBH

1999/Z007- Ma 1207- C38

Patent claims for USA:

1. A procedure for the determination of the activity of the protease which activates blood clotting factor VII from protein solutions, **characterized in that**

- the protein solution comprising the protease and/or its proenzyme is incubated with a solid phase to which an antibody directed against the protease has been coupled beforehand and
- after washing the solid phase the protease and/or its proenzyme fixed thereto are incubated with reagents which allow determination of their activity.

2. The procedure as claimed in claim 1, **wherein** the activity of the protease is measured by means of a photometric determination of the extinction occurring during action on chromogenic substrates.

3. The procedure as claimed in claim 1, **wherein** the activity of the protease is measured by means of

- its action which inactivates blood clotting factors VIII/VIIIa or V/Va or
- its action which reduces the blood clotting times in global clotting tests or
- its action which activates plasminogen activators or
- its action which activates FVII.

4. The procedure as claimed in claim 1, **wherein** the antibody directed against the protease is a polyclonal or monoclonal antibody or an F(ab) or F(ab)₂ antibody fragment.
5. A kit for the determination of the protease activating blood clotting factor VII.
6. A procedure for the early detection of an infarct, or stable or unstable angina pectoris, **wherein** the parameter determined is the protease activating blood clotting factor VII.
7. A procedure for the diagnosis of the course or of the degree of severity of an infarct or of the result of prophylaxis and/or therapy in the case of angina pectoris, **wherein** the parameter determined is the protease activating blood clotting factor VII.
8. A procedure for monitoring pregnancy, **wherein** the parameter determined is the protease activating blood clotting factor VII.
9. A procedure for the early detection of a risk of thrombosis, **wherein** the parameter determined is the protease activating blood clotting factor VII.

AVENTIS BEHRING GMBH

1999/Z007- Ma 1207-C 38

Abstract

Procedure for the determination of the activity of the protease which activates factor VII from protein solutions

A procedure for the determination of the activity of the protease which activates blood clotting factor VII from protein solutions is described, in which

- the protein solution comprising the protease and/or its proenzyme is incubated with a solid phase to which an antibody directed against the protease has been coupled beforehand and
- after washing the solid phase the protease and/or its proenzyme fixed thereto are incubated with reagents which allow determination of their activity.

FIG.1

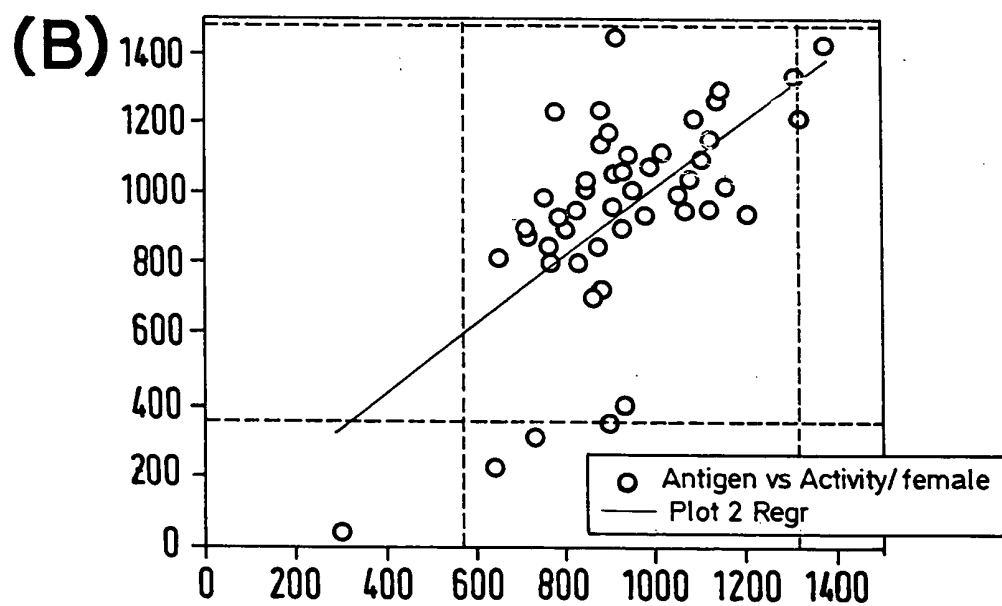
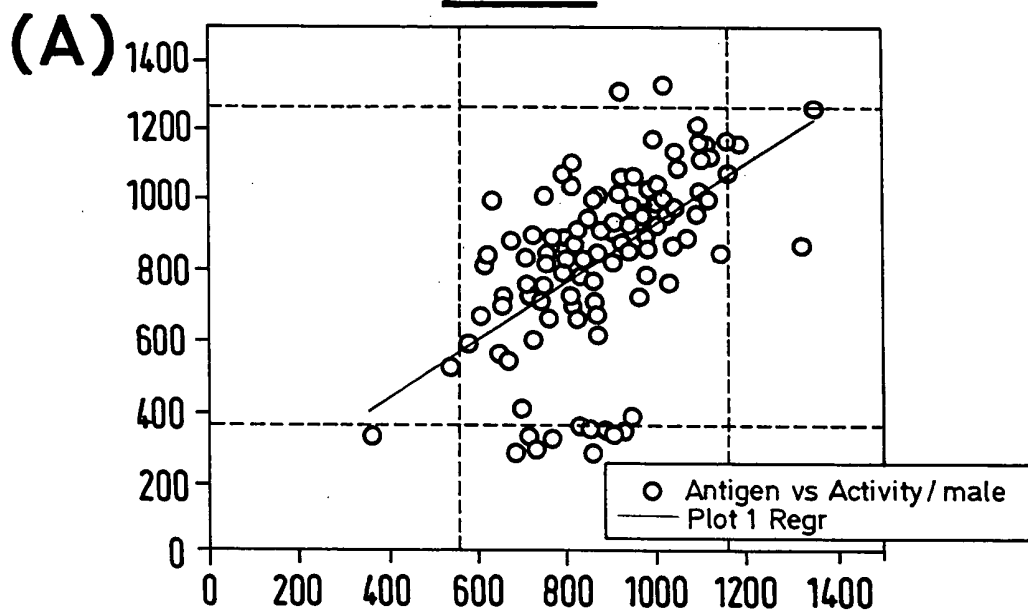


FIG.2

